

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

0 180 743  
A1

12

# EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 85111734.1

22 Anmeldetag: 17.09.85

51 Int. Cl.<sup>4</sup>: C 12 N 1/04

C 12 N 11/04, A 61 K 9/50  
A 61 K 35/74, A 01 N 63/00  
A 23 K 1/00

30 Priorität: 21.09.84 CH 4545/84

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
14.05.86 Patentblatt 86/20

64 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

71 Anmelder: Cernitin S.A.

CH-6911 Barbengo(CH)

72 Erfinder: Lewenstein, Ari  
Via Marco da Carona 5  
CH-Lugano(CH)

74 Vertreter: Blum, Rudolf Emil Ernst et al.  
c/o E. Blum & Co Patentanwälte Vorderberg 11  
CH-8044 Zürich(CH)

54 Lebende Mikroorganismen enthaltendes flüssiges Präparat, Verfahren zu dessen Herstellung, lebende Mikroorganismen enthaltendes pelletiertes Produkt und Verfahren zu dessen Herstellung.

57 Ein lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat, in dem die Mikroorganismen in einer flüssigen Oelphase suspendiert sind, lässt sich bei Zimmertemperatur zwei Jahre oder noch länger lagern, ohne dass wesentliche Anteile der lebenden Mikroorganismen abgestorben sind, wenn die in der Oelphase suspendierten Mikroorganismen von mindestens einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt sind, die in der Oelphase unlöslich ist. Die Schutzschicht soll vorzugsweise bei Zimmertemperatur fest und von den Mikroorganismen nicht abbaubar sein. Die Herstellung der Präparate erfolgt, indem man die aus dem Zuchtmedium abgetrennten Mikroorganismen mit einem wässrigen Medium vermischt, welches das wasserlösliche oder in Wasser quellende Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, diese Mischung mindestens so weit trocknet, dass das Material der Schutzschicht fest wird, vorzugsweise jedoch vollständig trocknet, und dann die getrockneten umhüllten Mikroorganismen in die Oelphase einbringt.

Die getrockneten, von der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen können auch mit inerten festen Produkten vermischt werden und bei erhöhten Temperaturen unter

Druck pelletiert werden. Auch diese Pellets sind mehrere Jahre unter Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Mikroorganismen bei Zimmertemperatur lagerfähig.

Titel der Erfindung

- Lebende Mikroorganismen enthaltendes  
flüssiges Präparat, Verfahren zu dessen Herstellung,  
5 lebende Mikroorganismen enthaltendes pelletiertes  
Produkt und Verfahren zu dessen Herstellung.

Hintergrund der Erfindung

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein  
lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat, das  
bei Zimmertemperatur lagerfähig ist, in flüssiger  
Form vorliegt und dadurch bei seiner Verwendung  
leicht dosierbar ist. Die lebenden Mikroorganismen  
15 dieser Präparate sind von einer wasserlöslichen oder  
in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt und in  
einer flüssigen Oelphase suspendiert, in welcher  
die Schutzschicht unlöslich ist.

- Des weiteren betrifft die Erfindung ein  
20 Verfahren zur Herstellung des lebende Mikroorganis-  
men enthaltenden Präparates und ferner ein pelletier-  
tes diätetisches Nahrungsmittel oder einen Futter-  
mittelzusatz, der die üblichen proteinhaltigen Kom-  
ponenten, stärkehaltigen Komponenten, sowie gege-  
25 benenfalls Mineralstoffe und Vitamine enthält und  
ausserdem lebende Mikroorganismen, die von der was-  
serlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht,  
die in Öl unlöslich ist, umhüllt sind. Ausserdem be-  
trifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung  
30 derartiger pelletierter diätetischer Nahrungsmittel.

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen,

im Ackerbau und in der Tierzucht schon grosse Schäden entstanden.

In trockener Form vorliegende Mikroorganismenpräparate, die zur Regulierung der Darflora dem Tierfutter zugesetzt werden, müssen vor ihrer Verwendung mit entsprechenden Mengen an Wasser vermischt werden. Dabei ergeben sich natürlich häufig Schwierigkeiten durch falsche Dosierung. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Gefässe, in denen das Präparat mit Wasser vermischt wurde, nach der Verwendung sorgsam gereinigt werden müssen, um die Mikroorganismen zu entfernen, die an den Gefässwänden haften geblieben sind. Auch eine Verunreinigung der Umgebung, beispielsweise des Stalles, durch Verschütten des wässrigen Mediums, welches die Mikroorganismenpräparate darin dispergiert enthält, muss sorgsam vermieden werden. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn der Mikroorganismus des Präparates ein Bakterium der Klasse Streptokokkus faecium ist, weil Oberflächen, die mit diesem Mikroorganismus verseucht sind, in kurzer Zeit einen äusserst unangenehmen Geruch entwickeln.

Es ist ferner bekannt, dass Mikroorganismen, die in wässrigen Flüssigkeiten dispergiert sind, innerhalb von wenigen Tagen ihre Aktivität verlieren, wenn sie beispielsweise bei Temperaturen im Bereich von 10 - 30° C aufbewahrt werden. Bei diesen Temperaturen führt die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen rasch zu einer Abtötung und Zerstörung der fraglichen Mikroorganismen.

Es ist ferner bekannt, dass lebende

beispielsweise Bakterien, bei sehr tiefen Temperaturen, die weit unter dem Gefrierpunkt liegen, einige Zeit hindurch gelagert werden können und dennoch ihre Lebensfähigkeit behalten. Bei der praktischen  
5 Verwendung von solchen lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparaten ist es jedoch nachteilig, dass eine Lagerung im tiefgefrorenen Zustand nötig ist.

Es ist ferner bekannt, Mikroorganismen durch Trocknung, insbesondere Gefriertrocknung, für  
10 einige Zeit in lebendem Zustand haltbar zu machen. Ein Nachteil dieser durch Gefriertrocknung hergestellten Präparate besteht darin, dass grosse Anteile der lebensfähigen Mikroorganismen dennoch bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur ihre Lebensfähigkeit  
15 verlieren. Die Hersteller derartiger Präparate verlangen deshalb, dass die Produkte im Kühlschrank aufbewahrt werden, um eine Haltbarkeit während einiger Monate zu gewährleisten. Wenn derartige Präparate in der Landwirtschaft eingesetzt werden, um Nutz-  
20 pflanzen oder Zierpflanzen gegen den Angriff von Schädlingen zu schützen oder in der Tierhaltung eingesetzt werden, um die Darmflora von Zuchttieren günstig zu beeinflussen, dann stehen häufig keine ausreichenden Kühlkapazitäten zur Verfügung und die  
25 Präparate werden oft von wenig geschulten Personen verwendet, für die es nicht offensichtlich ist, dass die fraglichen Präparate bei Aufbewahrung ausserhalb des Kühlschranks rasch ihre Aktivität verlieren. Durch die Verwendung von Präparaten, die vorzeitig  
30 ihre Aktivität verloren haben und dementsprechend nicht mehr die vermutete Wirksamkeit besitzen, sind

h

Mikroorganismen, die in einer Oelphase aus einem pflanzlichen Oel oder einem Mineralöl dispergiert sind, während gewisser Zeiträume ihre Lebensfähigkeit aufrecht erhalten. Derartige Präparate besitzen

5 gegenüber in trockener Form vorliegenden Mikroorganismenpräparaten den Vorteil einer leichteren Dosierbarkeit und in der Tierzucht ist es nicht nötig, die Präparate mit dem Futtermittel zu vermischen, sondern sie können auch direkt in flüssiger Form an

10 die Tiere verabreicht werden. Dadurch werden die oben beschriebenen Schwierigkeiten bezüglich der Verunreinigung der Umgebung vermieden. Dennoch ist jedoch die Haltbarkeit derartiger bisher beschriebener Präparate unbefriedigend, insbesondere dann, wenn sie

15 ausserhalb des Kühlschranks gelagert werden. Ein Ziel der vorliegenden Erfindung war es dementsprechend, ein lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat zu entwickeln, bei dem die Mikroorganismen in einer flüssigen Oelphase suspendiert sind, das jedoch

20 gegenüber bisher bekannten entsprechenden Präparaten eine verbesserte Lagerfähigkeit besitzt.

Futtermittelzusätze, die proteinhaltige Komponenten, stärkehaltige Komponenten, sowie gegebenenfalls Mineralstoffe und/oder Vitamine enthalten, werden häufig in pelletierter Form in den Handel gebracht, weil in dieser Form die Verabreichung besonders vorteilhaft ist. Lebende Mikroorganismen konnten jedoch derartigen pelletierten Nahrungsmitteln nicht einverleibt werden, weil sie den Pelletierungsvorgang, der ein Erhitzen nötig macht, nicht oder nur in geringem Masse überlebten.

25

30

Es wurde bereits versucht, Mikroorganismen mit einer Schicht aus wachsartigen Materialien zu überziehen und diese mit der Schutzschicht überzogenen Mikroorganismen, zusammen mit den übrigen  
 5 Komponenten des Futtermittelzusatzes, zu pelletieren. Bei der praktischen Durchführung dieses Verfahrens waren dann aber in den fertigen Futtermittelpellets noch zu wenige lebende Mikroorganismen enthalten.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein pelletiertes diätetisches Nahrungsmittel oder einen pelletierten Futtermittelzusatz zur  
 10 Verfügung zu stellen, wobei diese Produkte neben den üblichen Energie liefernden Bestandteilen, den üblichen Zusätzen, wie Mineralstoffen und/oder Vitaminen,  
 15 noch lebende Mikroorganismen enthalten sollen.

#### Stand der Technik

In der Schweizer Patentschrift Nr. 457 332 wird ein Verfahren zur Konservierung von  
 20 lebender Hefe beschrieben, die auf einen Wassergehalt von 5 bis 20 % entwässert ist und in einem wasserfreien Fettmaterial, das gegebenenfalls ein Emulgiermittel enthält, dispergiert ist. Gegebenenfalls enthält das Produkt noch rohe Stärke, deren Körnchen  
 25 vorzugsweise eine ähnliche Grösse besitzen, wie die Hefezellen.

In der belgischen Patentveröffentlichung Nr. 667 201 wird ein Verfahren zur Herstellung von  
 Zusammensetzungen beschrieben, die Bakterien, Enzyme  
 30 oder Ähnliches enthalten, wobei die fraglichen Zusammensetzungen gegen Feuchtigkeiten und chemische

Substanzen der Umgebung durch eine Umhüllung mit einer flüssigen Schutzschicht geschützt sind, die aus einem Öl, beispielsweise Pflanzenöl oder Paraffinöl, oder Propylenglykol (siehe Seite 2, Zeilen 21 bis 24) bestehen kann.

Die französische Patentveröffentlichung Nr. 2 233 941 betrifft Zusammensetzungen, die trockene Hefe und ein genießbares Fett oder Öl, sowie gegebenenfalls ausserdem Mehl enthalten. Des weiteren können in diesen Zusammensetzungen geringe Mengen an zusätzlichen Bestandteilen enthalten sein, die bei der Verwendung des Produktes die Konsistenz des Teiges günstig beeinflussen, wie zum Beispiel L-Cystein oder Azodicarbonamid.

In der USA-Patentschrift Nr. 3 034 968 wird ein Verfahren zur Herstellung von lebensfähigen trockenen Mikroorganismen aus der Klasse Bakterien und Schimmelpilze beschrieben, wobei die Trocknung in einem Öl vorgenommen werden kann. Es wurde ferner festgestellt, dass in dem Endprodukt mehr lebende Mikroorganismen enthalten sind, wenn die feuchten Mikroorganismen während des Trockenvorganges mit einem von ihnen abbaubaren Kohlehydrat in Berührung stehen, wie zum Beispiel Saccharose, Dextrose, Maltose und Stärkehydrolysate. Nach dem Trocknungsvorgang werden die Mikroorganismen im allgemeinen von dem Öl befreit, sodass die Endprodukte nurmehr einen Ölgehalt von 10 % oder 5 % oder noch geringere Ölgehalte aufweisen. Früher wurde festgestellt, dass es bei der Gefriertrocknung von verschiedenen feuchten Bakterienstämmen vorteilhaft ist, wenn vorher dem

jh

- wässrigen Medium verschiedene Materialien zugesetzt werden, wie Glucose, Detrin, Ammoniumchlorid und Aehnliches (siehe die Veröffentlichungen von Record und Taylor in J. Gen. Microbiol., Band 9, S. 475, 1953 und von Naylor und Smith in J. Bact., Band 52, S. 565, 1946).

- In der französischen Patentveröffentlichung Nr. 1 242 371 wird ein Verfahren zur Herstellung einer aktiven Trockenhefe beschrieben, bei dem die Hefe in einer Flüssigkeit, beispielsweise einem essbaren Oel, suspendiert und getrocknet wird. Auch in diesem Fall wurden in dem Endprodukt ein höherer Gehalt an lebenden Hefezellen festgestellt, wenn während des Trocknungsvorganges ein von der Hefe abbaubares Kohlehydrat anwesend war, beispielsweise Zucker oder Maissirup.

- Weitere Verfahren, gemäss denen lebende Mikroorganismen haltbar gemacht werden, indem man sie mit einem Oel beschichtet oder in einem Oel suspendiert, sind in der USA-Patentschrift Nr. 1 457 097 und der britischen Patentschrift Nr. 1 151 669 beschrieben.

- Die französische Patentveröffentlichung Nr. 2 116 110 betrifft Produkte, bei denen Mikroorganismen in nicht öligen Suspensionsmitteln suspendiert sind, wie zum Beispiel in wasserlöslichen Alginaten, Gelatine, natürlichen Gummen, kolloidaler Kiesselsäure, Zellulosegummen, sauren Polysacchariden, Polysaccharidderivaten von Algen und insbesondere Natriumalginat. Die Produkte, in denen die Mikroorganismen suspendiert sind, sollen keinerlei Nährwirkung für



die Mikroorganismen besitzen (siehe Seite 2, Zeilen 32 bis 36).

- Auch in der europäischen Patentveröffentlichung Nr. 0 097 571 werden Mikroorganismenkulturen beschrieben, die in einem Polymergel eingeschlossen sind und deren Wassergehalt unter 0,3 % liegt.

### Beschreibung der Erfindung

- 10                   Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat zur Verfügung zu stellen, bei dem die Mikroorganismen in einer flüssigen Oelphase suspendiert sind, wobei dieses Präparat im Vergleich zu bisher bekannten  
15   entsprechenden Präparaten, eine wesentlich erhöhte Lagerfähigkeit bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur besitzen soll. Ueberraschenderweise zeigte es sich, dass die angestrebten Ziele erreicht werden können, indem man die Mikroorganismen mit mindestens  
20   einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt, ehe sie in der flüssigen Oelphase suspendiert sind.

- Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein lebende Mikroorganismen enthaltendes  
25   Präparat, bei dem die Mikroorganismen in einer flüssigen Oelphase suspendiert sind, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein bei Zimmertemperatur lagerfähiges Präparat ist, und dass die Mikroorganismen, die in der Oelphase suspendiert sind, von mindestens  
30   einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt sind, die in der Oelphase unlöslich ist, wobei die Oelphase aus einem Mineralöl

und/oder pflanzlichen Öl und/oder tierischen Öl, und/oder synthetischen flüssigen Fettsäureester aufgebaut ist.

- Vorzugsweise besteht die Schutzschicht
- 5 aus dem wasserquellbaren oder wasserlöslichen Material aus einem entsprechenden Produkt, das bei Zimmertemperatur fest ist und das ferner vorzugsweise von den Mikroorganismen nicht abbaubar ist. Bevorzugte Materialien der die Mikroorganismen umhüllenden Schutzschicht sind wasserlösliche Zellulosederivate, wasserlösliche Stärkederivate, wasserlösliche Pflanzengummen, wasserlösliche Pektine oder Mischungen aus zwei oder mehr derartigen wasserlöslichen Produkten. Besonders gute Ergebnisse bezüglich der Haltbarkeit der lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparate wurden dabei erzielt, wenn als Material für die Schutzschicht wasserlösliche pflanzliche Gummen verwendet werden, insbesondere Gummiarabikum.

- Es zeigte sich ferner, dass die Lebensfähigkeit der in den erfindungsgemässen Präparaten enthaltenen Mikroorganismen bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur über mehr als zwei Jahre gewährleistet werden kann, indem man die von der wasserlöslichen oder wasserquellbaren Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen trocknet, beispielsweise gefriertrocknet oder sprühtrocknet und die getrockneten, von der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen dann in der Ölphase suspendiert. In bevorzugten erfindungsgemässen Präparaten liegen dementsprechend die Mikroorganismen in getrockneter Form vor und die sie umhüllende wasserlösliche oder wasserquellbare

Schutzschicht ist ebenfalls in im wesentlichen wasserfreiem Zustand anwesend.

Die erfindungsgemässen flüssigen Präparate enthalten im allgemeinen  $10^7$  bis  $10^{10}$  von der Schutzschicht umhüllte Mikroorganismen pro ml Oel, und vorzugsweise  $10^8$  bis  $10^9$  von der Schutzschicht umhüllte Mikroorganismen pro ml Oel.

Das Material der Schutzschicht wird im allgemeinen in solchen Mengen eingesetzt, dass im trockenen Zustand ein Gewichtsteil an Mikroorganismen mit 0,5 bis 10 Gew.-Teilen, vorzugsweise 2 bis 6 Gew.-Teilen, des trockenen Materiales aus der wasserlöslichen oder wasserqueillbaren Schutzschicht umhüllt sind.

Die erfindungsgemässen lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparate enthalten vorzugsweise als Mikroorganismen Bakterien oder Pilze, gegebenenfalls können jedoch die Mikroorganismen auch entsprechend umhüllte Hefen sein.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsart der Erfindung ist das lebende Mikroorganismen enthaltende Präparat ein in der Humanmedizin oder Veterinärmedizin einsetzbares Präparat, welches solche Mikroorganismenstämme enthält, die sich in der Mikroorganismenflora des Magen-Darmtraktes vorteilhaft auswirken. Diese Mikroorganismen können beispielsweise Milchsäure bildende Bakterien sein.

Es ist bekannt, dass es vorteilhaft ist, bei der Aufzucht von Jungtieren, insbesondere jungen Schweinen, die Darmflora der Tiere mit einem Bakterienstamm von Streptokokkus faecium anzureichern. Es ist

- ferner bekannt, dass durch Verabreichung dieses Bakterienstammes auch das Wachstum der Tiere gesteigert werden kann. Wenn man zu diesem Zwecke ein getrocknetes pulverförmiges Präparat verwendet, das den
- 5 Streptokokkus faecium enthält und dieses mit Wasser anrührt und sodann dem Futter beisetzt, dann ergeben sich die weiter vorne ausführlich erläuterten Nachteile bezüglich der unerwünschten Geruchsentwicklung auf Oberflächen, die mit dem fraglichen Bakterium
  - 10 verunreinigt sind. Erfindungsgemässe flüssige Präparate, die einen Bakterienstamm von Streptokokkus faecium, vorzugsweise den Stamm Streptokokkus faecium Cernelle 68, der von der wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt ist, in dem Öl
  - 15 dispergiert enthalten, können ohne vorherige Verdünnung direkt in der gewünschten Dosis an die Tiere verabreicht werden. Vorzugsweise sind diese Präparate in einem entsprechenden Behälter abgepackt, der es erlaubt, den Ferkelchen eine gewünschte Einzeldosis durch Einträufeln oder Einspritzen in das Maul
  - 20 zu verabreichen.

- Gemäss einer weiteren Ausführungsart der Erfindung ist das lebende Mikroorganismen enthaltende Präparat ein bei der Züchtung von Nutzpflanzen oder
- 25 Zierpflanzen eingesetztes Präparat, welches solche Mikroorganismenstämme enthält, die krankheitserregend gegenüber tierischen und pflanzlichen Schädlingen, insbesondere Schadinsekten, sind.

- Bei der Verwendung derartiger Präparate
- 30 kann man das flüssige Öl enthaltende Präparat direkt auf die Pflanzen oder ihre Umgebung aufbringen. Im all-

h

- gemeinen ist es jedoch vorteilhafter, das fragliche Präparat, zusammen mit einem entsprechenden Dispersiermittel, in Wasser einzubringen und darin zu dispergieren und die entsprechend verdünnte Lösung, beziehungsweise Dispersion, dann auf die Pflanzen und/oder ihre Umgebung, beispielsweise den Erdboden, aufzusprühen, beziehungsweise die entsprechende Flüssigkeit als Giessflüssigkeit einzusetzen.

- Derartige Präparate sind ferner auch geeignet, um gelagerte landwirtschaftliche Produkte oder Lebensmittel gegen den Angriff von Schädlingen, insbesondere tierischen Schädlingen, wie Schadinsekten, zu schützen.

- Die erfindungsgemässen lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparate können ferner bei der industriellen Herstellung von Nahrungsmitteln angewandt werden, beispielsweise um Milchsäuregärungen oder alkoholische Gärungen durchzuführen.

- Bekanntlich sind sehr viele spezielle Käsesorten nur in sehr begrenzten Regionen herstellbar, weil die Erzeugung des fraglichen Käses von der in der speziellen Region vorliegenden Mikroorganismenpopulation abhängig ist, welche die Umwandlung des Milchkoagulates, das durch Milchsäuregärung oder Labzugabe gewonnen wurde, in die spezielle Käsesorte, bewirkt. Für die Käseherstellung sind natürlich auch die klimatischen Bedingungen wichtig, insbesondere Temperatur und Luftfeuchtigkeit, die während der Umwandlung des Milchkoagulates in Käse vorherrschen.
- Die klimatischen Bedingungen einer bestimmten Region können durch Einhaltung entsprechender Temperaturen

- und Luftfeuchtigkeiten auch an anderen Orten, beispielsweise einer im Tiefland liegenden Käserei, simuliert werden. Doch war es bei vielen Käsesorten bisher nicht möglich, sie an fremden Orten herzustellen, weil die fragliche Mikroorganismenpopulation dort nicht vorhanden war. Erfindungsgemässe Präparate, in welchen die von der wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllten, in der Oelphase suspendierten Mikroorganismen diejenige Mikroorganismenpopulation sind, die zur Herstellung einer bestimmten Käsesorte nötig ist, können somit verwendet werden, um die fragliche Käsesorte an einem fremden Ort zu erzeugen.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemässen lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparates. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man die Mikroorganismen aus dem Zuchtmedium abtrennt und sie mit einem wässrigen Medium vermischt, welches das in der Oelphase unlösliche, wasserlösliche oder in Wasser quellende Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, diese Mischung mindestens so weit trocknet, dass die Mikroorganismen von der festen Schutzschicht aus dem wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material umhüllt werden und die umhüllten Mikroorganismen in der Oelphase, die aus einem Mineralöl und/oder pflanzlichen Öl und/oder tierischen Öl, und/oder synthetischen flüssigen Fettsäureester aufgebaut ist, suspendiert.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsart

dieses Verfahrens wird die Trocknung der mit der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen so weit fortgesetzt, dass die Mikroorganismen getrocknet werden und die wasserlösliche oder wasserque-  
5 bare Schutzschicht ebenfalls in einen im wesentlichen wasserfreien Zustand übergeführt wird, und diese getrockneten umhüllten Mikroorganismen werden dann in der Oelphase dispergiert.

Besonders vorteilhaft ist es, die Trock-  
10 nung der Mischung aus den Mikroorganismen und dem wässrigen Medium, welches das Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, als Gefriertrocknung durchzuführen. Es zeigte sich jedoch, dass während des Trocknungsvorganges die sich aus-  
15 bildende Schutzschicht aus dem festen wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material die Mikroorganismen ausreichend schützt, sodass gegebenenfalls die Trocknung auch als Sprühtrocknung vorgenommen werden kann. Bei der Herstellung der erfindungsgemässen Präparate wird vorzugsweise ein Ge-  
20 wichtsteil des Materiales der Schutzschicht in 5 bis 15 Gew.-Teilen Wasser, vorzugsweise 8 bis 12 Gew.-Teilen Wasser, gelöst und die aus dem Zuchtmedium abgetrennten Mikroorganismen werden in dieser  
25 Lösung dispergiert, vorzugsweise in einem Gewichtsverhältnis von 1 Gew.-Teil der feuchten, abgetrennten Mikroorganismen zu 1 bis 10 Gew.-Teilen, vorzugsweise 3 bis 6 Gew.-Teilen, dieser wässrigen Lösung.

30 Als Oelphase können in den erfindungsgemässen Präparaten verschiedene pflanzliche oder

- tierische Öle eingesetzt werden. Es zeigte sich dabei, dass solche tierischen Öle und pflanzlichen Öle, die geringere Anteile an Resten ungesättigter Fettsäuren enthalten, besser geeignet sind, als
- 5 solche tierischen Öle und pflanzlichen Öle, die einen höheren Anteil an Resten ungesättigter Fettsäuren aufweisen. Es wurden viele Öle getestet, wie zum Beispiel Olivenöl, Erdnussöl, Sojaöl, Reis-
- 10 keimöl, Maisöl, Sonnenblumenöl, Rapsöl, Jojobaöl und andere. Es zeigte sich dabei, dass Erdnussöl besonders gut geeignet ist und auch mit Sonnenblumenöl und Reiskeimöl waren gut geeignet.

- Auch mit sogenannten synthetischen Ölen konnten gute Erfolge erzielt werden. Diese unterscheiden sich von den tierischen und pflanzlichen
- 15 Ölen, die bekanntlich hauptsächlich aus Fettsäuretriglyceriden bestehen, dadurch, dass sie Fettsäureester einwertiger Alkohole darstellen oder Mischungen derselben enthalten. Als Beispiel für synthetische
- 20 flüssige Fettsäureester seien genannt: Myristinsäureisopropylester, Palmitinsäureisopropylester, Ölsäureäthylester, Oleyl-oleat und ähnliche Produkte. Auch das sogenannte Neutraöl mit der Markenbezeichnung "Miglyal" liefert gute Ergebnisse.

- 25 Die durchgeführten Versuche zeigten ferner, dass solche erfindungsgemässen Präparate, die als Öelphase ein Mineralöl enthalten, eine längere Lagerfähigkeit besitzen, als solche Präparate, die ein pflanzliches und/oder tierisches Öl enthalten.
- 30 Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn als Öelphase Paraffinöl verwendet wurde.



- Es wurden Vergleichsversuche durchgeführt, die zeigten, dass trockene Mikroorganismen, die von keiner Schutzschicht umhüllt sind, und in einer bestimmten Oelphase dispergiert sind, bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur eine wesentlich geringere Lagerfähigkeit besitzen, als die gleichen Mikroorganismenstämme, die von der wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt sind und im trockenen Zustand ebenfalls in dem gleichen Oel suspendiert wurden. In den erfindungsgemässen Präparaten waren nach einer dreijährigen Lagerung bei Zimmertemperatur nur 20 bis 40 % der Mikroorganismen abgestorben. Im Gegensatz dazu waren bei den Präparaten zu Vergleichszwecken, bei welchen die gleichen Mikroorganismen in unumhüllten Zustand in der gleichen Oelphase dispergiert waren, bereits nach einer Lagerungszeit von drei Monaten bei Zimmertemperatur 20 bis 40 % der lebenden Mikroorganismen abgestorben.
- Die getrockneten, von der Schutzschicht aus dem wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material umhüllten Mikroorganismen, besitzen bei Lagerung bei Zimmertemperatur eine höhere Ueberlebensrate als entsprechende, ohne umhüllende Schutzschicht getrocknete Mikroorganismen. Versuche zu Vergleichszwecken zeigten jedoch, dass entsprechende, von der wasserlöslichen oder wasserquellenden Schutzschicht umhüllte Mikroorganismen, die bei Zimmertemperatur trocken aufbewahrt, jedoch nicht in einer Oelphase dispergiert waren, keine ausreichende Haltbarkeit besitzen. Nach einer Lagerungszeit

u

von zwei bis vier Wochen bei Zimmertemperatur waren schon 20 bis 40 % der Mikroorganismen abgestorben.

- Ueberraschenderweise zeigte es sich jedoch, dass lebende Mikroorganismen, die nur von der wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht umhüllt sind, kurzzeitig hohe Temperaturen überleben, wenn sie dabei von einem Feststoff oder Gemisch von Feststoffen umgeben werden, das fest zusammengepresst wird und so bei der weiteren Lagerung des Produktes eine puffernde Wirkung gegen den Zutritt von Luftsauerstoff oder atmosphärischer Feuchtigkeit zu den von der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen ausübt.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein pelletiertes Produkt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es lebende Mikroorganismen enthält, die von einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht, die in Mineralöl, pflanzlichem Öl, tierischen Ölen, synthetischen flüssigen Fettsäureestern, sowie Mischungen davon, unlöslich ist, umhüllt sind, wobei in dem pelletierten Produkt die Mikroorganismen in einem fest zusammengepressten Feststoff oder Gemisch auf Feststoffen, eingebettet sind und diese zusammengepressten Feststoffe den Zutritt von Sauerstoff oder atmosphärischer Feuchtigkeit zu den eingebetteten Mikroorganismen hemmen.

- Derartige pelletierte Produkte, die lebende Mikroorganismen enthalten, besitzen im Vergleich zu pulverförmigen lebende Mikroorganismen enthaltenen Produkten ferner den Vorteil der leichteren Dosierbarkeit.

Dr.IM.-vd  
13.9.1985

Ein bevorzugtes, lebende Mikroorganismen enthaltendes, pelletiertes Produkt ist ein entsprechendes pelletiertes diätetisches Nahrungsmittel oder ein pelletierter Futtermittelzusatz. In diesem Falle sind die zusammengepressten Feststoffe, in denen die umhüllten Mikroorganismen eingebettet sind, proteinhaltige Bestandteile, stärkehaltige Bestandteile, Mineralstoffe oder Mischungen aus zwei oder mehr derartigen Komponenten. Gegebenenfalls enthalten diese Produkte ausserdem noch Vitamine.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines lebende Mikroorganismen enthaltenden pelletierten Produktes. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man die lebenden Mikroorganismen aus dem Zuchtmedium abtrennt und sie mit einem wässrigen Medium vermischt, welches das in Mineralöl, pflanzlichem Oel, tierischem Oel, synthetischen flüssigen Fettsäureestern und Mischungen davon unlösliche, jedoch wasserlösliche oder in Wasser quellende Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, diese Mischung mindestens so weit trocknet, dass die Mikroorganismen von der festen Schutzschicht aus dem wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material umhüllt werden und die umhüllten Mikroorganismen mit dem Feststoff oder dem Gemisch aus Feststoffen, vermischt und diese Mischung in Anwesenheit von Dampf bei einer Temperatur von 70 - 90° C unter Druck pelletiert.

Wenn dieses Verfahren zur Herstellung von Futtermittelpellets oder Pellets eines diätetischen

- Nahrungsmittels angewandt wird, dann ist es nicht nötig, dass entsprechende proteinhaltige Bestandteile oder stärkehaltige Bestandteile in vollständig trockenem Zustand zugefügt werden, sondern sie können ohne weiteres ziemlich feucht sein, sofern gewährleistet ist, dass sofort nach der Vermischung der umhüllten Mikroorganismen mit diesen Produkten der Pelletierungsvorgang vorgenommen wird. Bei der Pelletierung entweicht nämlich die überschüssige Feuchtigkeit noch ehe die die Mikroorganismen umhüllende Schutzschicht in irgendeinem wesentlichen Ausmass gelöst wird oder zu quellen beginnt.

- Die Erfindung sei nun anhand von speziellen Beispielen näher erläutert, die jedoch den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung in keiner Weise einschränken sollen.

20

Dr.IM.-vd  
13.9.1985

- 18a -

m

Beispiel 1Herstellung eines Präparates, welches als Mikroorganismus ein Bakterium enthält

- 5 Als Bakterienstamm wurde der Stamm Streptococcus faecium SF68 verwendet. Dieser wurde in üblicher Weise gezüchtet und durch Zentrifugieren aus dem Zuchtmedium abgetrennt. Nach dem Waschen wurde die abgetrennte Bakterienmasse mit einer Lösung von einem Teil Gummiarabikum in neun Teilen Wasser vermischt. Das Gewichtsverhältnis von abzentrifugierten Bakterien zu der Gummiarabikumlösung betrug etwa 1 : 4.
- 10

- 15 Der so erhaltene Brei wurde dann gefriergetrocknet. Es bildeten sich dabei kleine Kügelchen, welche die mit der Gummiarabikum-Schutzschicht überzogenen Bakterien enthielten.

- Das Produkt wurde von groben Partikeln abgesiebt und in der Oelphase suspendiert.
- 20 Die Menge an der Oelphase wurde dabei so gewählt, dass jeweils  $10 - 100 \times 10^8$  Mikroorganismen pro ml Oel enthalten waren.

Beispiel 225 Testung der Lagerfähigkeit

- Es wurde das nach dem Verfahren gemäß Beispiel 1 hergestellte erfindungsgemässe Präparat getestet und ferner auch ein Präparat zu Vergleichszwecken, bei dem der gleiche Mikroorganismenstamm nach der Abtrennung aus dem Zuchtmedium gewaschen
- 30

und ohne Zugabe einer Lösung von Gummiarabikum direkt gefrier-getrocknet wurde. Dieses gefriergetrocknete Produkt wurde in der Oelphase in einer solchen Menge suspendiert, dass wieder  $10 - 100 \times 10^8$   
5 unumhüllte Mikroorganismen pro ml Oel enthalten waren.

Sowohl beim erfindungsgemässen Präparat als auch bei dem Präparat zu Vergleichszwecken, wurde als Oelphase Paraffinöl verwendet.

10 Bei den erfindungsgemässen Präparaten und den Präparaten zu Vergleichszwecken wurde am Beginn des Tests die Anzahl der lebenden Keime pro ml Paraffinöl bestimmt und nach einer Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur wurde wieder die Anzahl  
15 der lebenden Keime pro ml Paraffinöl getestet. Die bei diesen Tests erzielten Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

20

25

30

Dr.IM.-vd  
2.9.1985

M

Präparat	Anzahl der lebenden Keime pro ml bei Testbeginn	bei Testende	Testdauer in Tagen	% der während der Testdauer abgestorbenen Mikroorganismen
erfindungs- gemäss	$89 \cdot 10^8$	$59 \cdot 10^8$	603	34
erfindungs- gemäss	$77 \cdot 10^8$	$52 \cdot 10^8$	603	32
vergleich	$182 \cdot 10^7$	$133 \cdot 10^7$	98	27
Vergleich	$147 \cdot 10^7$	$96 \cdot 10^7$	98	35

Man sieht aus den in der Tabelle angeführten Werten, dass in den Präparaten zu Vergleichszwecken, nach einer Testzeit von nur 98 Tagen ein Verlust an lebenden Keimen von 25 %, bzw. 35 % aufgetreten war. Die erfindungsgemässen Präparate, bei welchen die gleichen Mikroorganismen, jedoch umhüllt von der Schutzschicht aus Gummiarabikum, dispergiert in dem Paraffinöl getestet wurden, waren nach einer Lagerungszeit von nahezu zwei Jahren bei Zimmertemperatur, nämlich einer Lagerung von 603 Tagen, nur 34 %, bzw. 32 % der am Testbeginn vorhandenen lebenden Mikroorganismen abgestorben.

15

20

25

30

Dr.IM.-vd  
2.9.1985

h



Patentansprüche

1. Lebende Mikroorganismen enthaltendes  
Präparat, bei dem die Mikroorganismen in einer flüs-  
5 sigen Oelphase suspendiert sind, dadurch gekennzeich-  
net, dass das Präparat ein bei Zimmertemperatur lager-  
fähiges Präparat ist, und dass die Mikroorganismen,  
die in der Oelphase suspendiert sind, von mindestens  
einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden  
10 Schutzschicht umhüllt sind, die in der Oelphase un-  
löslich ist, wobei die Oelphase aus einem Mineralöl  
und/oder pflanzlichen Oel und/oder tierischen Oel,  
und/oder synthetischen flüssigen Fettsäureester auf-  
gebaut ist.

15

2. Lebende Mikroorganismen enthaltendes  
Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass die die Mikroorganismen umhüllende wasserlösliche  
oder wasserquellbare Schutzschicht aus einem Material  
20 besteht, das bei Zimmertemperatur fest ist und von  
den Mikroorganismen nicht abbaubar ist.

3. Lebende Mikroorganismen enthaltendes  
Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeich-  
25 net, dass die die Mikroorganismen umhüllende Schutz-  
schicht eine Schutzschicht aus einem wasserlöslichen  
Zellulosederivat, einem wasserlöslichen Stärkederi-  
vat, einem wasserlöslichen Pflanzengummi, einem was-  
serlöslichen Pektin oder einer Mischung aus zwei oder  
30 mehr derartigen wasserlöslichen Produkten ist.

ch

4. Lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen in getrockneter Form vorliegen und die sie umhüllende, wasserlösliche oder wasserquellbare Schutzschicht ebenfalls in im wesentlichen wasserfreien Zustand vorhanden ist.

5. Lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass im trockenen Zustand ein Gewichtsteil an Mikroorganismen von 0,5 bis 10 Gew.-Teilen, vorzugsweise 2 bis 6 Gew.-Teilen, des Materiales aus der wasserlöslichen oder wasserquellbaren Schutzschicht umhüllt sind.

6. Lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es als Mikroorganismen Bakterien oder Pilze enthält.

7. Lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es ein in der Humanmedizin oder Veterinärmedizin einsetzbares Präparat ist, welches solche Mikroorganismenstämme enthält, die sich in der Mikroorganismenflora des Magen-Darmtraktes vorteilhaft auswirken, vorzugsweise Milchsäure bildende Bakterien, vorzugsweise Bakterienstämme von Streptokokkus faecium, insbesondere Streptokokkus faecium Cernelle 68.

8. Lebende Mikroorganismen enthaltendes Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es ein bei der Züchtung von Nutzpflanzen oder Zierpflanzen eingesetztes Präparat ist, welches solche Mikroorganismenstämme enthält, die krankheitserregend gegenüber tierischen und pflanzlichen Schädlingen, insbesondere Schadinsekten, sind.

9. Verfahren zur Herstellung des lebende Mikroorganismen enthaltenden Präparates gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Mikroorganismen aus dem Zuchtmedium abtrennt und sie mit einem wässrigen Medium vermischt, welches das in der Oelphase unlösliche, wasserlösliche oder in Wasser quellende Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, diese Mischung mindestens so weit trocknet, dass die Mikroorganismen von der festen Schutzschicht aus dem wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material umhüllt werden und die umhüllten Mikroorganismen in der Oelphase, die aus einem Mineralöl und/oder pflanzlichen Oel und/oder tierischen Oel, und/oder synthetischen flüssigen Fettsäureester aufgebaut ist, suspendiert.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Trocknung der mit der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen so weit fortsetzt, dass die Mikroorganismen getrocknet werden und die wasserlösliche oder wasserquellbare Schutzschicht ebenfalls in einen im wesentlichen wasser-

h

freien Zustand übergeführt wird, wobei diese Trocknung vorzugsweise durch Gefrier Trocknung oder Sprühtrocknung durchgeführt wird, und anschliessend dann das trockene umhüllte Material in der Oelphase  
 5 dispergiert.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass man ein wasserlösliches Zellulosederivat, ein wasserlösliches Stärkederivat,  
 10 einen wasserlöslichen Pflanzengummi, beispielsweise Gummiarabikum, ein wasserlösliches Pektin oder eine Mischung aus zwei oder mehr derartigen wasserlöslichen Produkten in Wasser löst, vorzugsweise in einer Menge  
 15 von einem Gewichtsteil dieses Materiales der Schutzschicht, in 5 bis 15 Gew.-Teilen Wasser, und die abgetrennten Mikroorganismen mit dieser wässrigen Lösung in einem Gewichtsverhältnis von 1 Gew.-Teil Mikroorganismen zu 1 bis 10 Teilen, vorzugsweise  
 3 bis 6 Teilen, der wässrigen Lösung vermischt.

20 12. Pelletiertes Produkt, dadurch gekennzeichnet, dass es lebende Mikroorganismen enthält, die von einer wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Schutzschicht, die in Mineralöl, pflanzlichem  
 25 Oel, tierischen Oelen, synthetischen flüssigen Fettsäureestern, sowie Mischungen davon, unlöslich ist, umhüllt sind, wobei die von der Schutzschicht umhüllten Mikroorganismen in einem fest zusammengepressten Feststoff <sup>und</sup> oder ein Gemisch aus Feststoffen, eingebettet sind / diese Feststoffe als Puffer für den Zutritt  
 30 von Luftsauerstoff oder atmosphärischer Feuchtigkeit

zu den von der Schutzschicht umhüllten lebenden Mikroorganismen wirken.

13. Pelletiertes Produkt nach Anspruch
- 5 12, dadurch gekennzeichnet, dass es ein pelletiertes diätetisches Nahrungsmittel oder ein Futtermittelzusatz ist, in dem die zusammengepressten Feststoffe, in welchen die umhüllten Mikroorganismen eingebettet sind, proteinhaltige und/oder stärkehaltige Produkte
- 10 sind, und wobei gegebenenfalls in dem pelletierten Produkt noch Mineralstoffe oder Vitamine vorhanden sind.

14. Verfahren zur Herstellung des pelletierten Produktes gemäss Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die lebenden Mikroorganismen aus dem Zuchtmedium abtrennt und sie mit einem wässrigen Medium vermischt, welches das in Mineralöl, pflanzlichem Öl, tierischem Öl, synthetischen flüssigen
- 20 Fettsäureestern und Mischungen davon unlösliche, jedoch wasserlösliche oder in Wasser quellende Material der Schutzschicht gelöst oder dispergiert enthält, diese Mischung mindestens so weit trocknet, dass die Mikroorganismen von der festen Schutzschicht aus dem
- 25 wasserlöslichen oder in Wasser quellenden Material umhüllt werden und die umhüllten Mikroorganismen mit dem Feststoff oder dem Gemisch aus Feststoffen vermischt und diese Mischung in Anwesenheit von Dampf bei einer Temperatur von 70 - 90° C unter Druck pelletiert.
- 30



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (in Cl. 4)
Y	CH-A- 457 332 (H. GRIFFON) * Anspruch; Unteransprüche 1-3,8,18; Spalte 3, Zeilen 21-25; Spalte 4, Zeilen 36-46; Spalte 4, Zeile 66 - Spalte 5, Zeile 3 *	1-11	C 12 N 1/04 C 12 N 11/04 A 61 K 9/50 A 61 K 35/74 A 01 N 63/00 A 23 K 1/00
Y	EP-A-0 006 671 (H. MÜLLER) * Ansprüche 1,3,4,6-10 *	1-11	
Y	EP-A-0 065 376 (TATE & LYLE PUBLIC LTD., CO.) * Ansprüche 1-9; Seite 6, Zeilen 6-13 *	1-11	
X	GB-A-2 016 043 (DANOCHEMO AS) * Ansprüche; Seite 1, Zeilen 31-45; Seite 3, Zeilen 46-61; Beispiel 1 *	12-14	
A	LU-A- 60 508 (AB CERNELLE) * Ansprüche 1,2 *	7	C 12 N A 61 K A 23 K A 01 N
A	EP-A-0 097 571 (RHONE-POULENC SA) * Ansprüche 1-9; Seite 6, Zeilen 1-20; Seite 7, Zeilen 32-36 *	8	
A	WO-A-8 303 102 (K. MOSBACH et al.) * Ansprüche *	1-11	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 20-01-1986	Prüfer RYCKEBOSCH A.O.A.
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A : technologischer Hintergrund</p> <p>O : nichtschriftliche Offenbarung</p> <p>P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			